

## 【発明の名称】

癌の長期再発予防法および癌の長期再発予防用活性化リンパ球を含む製剤

## 【発明の背景】

## 1. 技術分野：

[0001] 本発明は、癌再発を長期に予防する方法、および、癌の長期再発予防用活性化リンパ球を含む製剤に関するもので、特に、癌、特に肝臓癌の外科的手術後もしくは化学的療法又は放射線療法による治療後、少なくとも5年以上の長期にわたる再発予防法および癌の長期再発予防用活性化リンパ球を含む製剤に関する。

## 2. 従来の技術：

[0002] リンパ球の増殖が固相化した抗CD3抗体とインターロイキン2により可能であること、およびこれによって増殖されたリンパ球が抗腫瘍効果を有することに関しては、すでに本発明者によって報告済みである（特開平3-80076号公報参照）。

[0003] これらの報告は、いずれもリンパ球の投与によって、投与開始時から1～2年程度の間、癌の再発予防や抗腫瘍活性に効果があることが明らかにされているが、リンパ球の投与のみによっては実質的に、また臨床的に意義を有し、また癌の評価の目安とされる5年以上の長期間に渡った癌の再発を予防することができない。

[0004] またその他の報告でも活性化リンパ球による癌の再発予防の可能性は指摘されているものの、いずれの場合も活性化リンパ球が長期間にわたり癌の再発を予防できるか否かを明らかにしていない。

[0005] また抗CD3抗体あるいはインターロイキン2により末梢血等に由来するリンパ球を増殖することが可能であること、さらにインターロイキン2により増殖させたリンパ球を、化学療法と用いることにより肺癌に一定の効果が認められること、またリンパ球を凍結して使用時に融解し、これを増殖して用いることも知られている。さらにローゼンバーグらは、インターロイキン2で活性化したLAK細胞が抗腫瘍活性を有することを報告しているが、LAK細胞が癌の再発を予防するか否かを明らかにしていない。

[0006] しかしながら、上記はいずれも活性化リンパ球投与による癌の2年間程度の短期間の再発予防や抗腫瘍活性に関するものであり、外科的手術や化学治療、あるいは放射線治療等との併用により、少なくとも5年以上の長期間にわたり癌の再発を防止することを示した

ものはこれまでにない。また癌の治療手段として最も多く使用されている化学療法剤は、一般的に抗腫瘍効果（癌を小さくする効果）は有するが、副作用を伴わないで再発を防止する効果は少ない。

#### 【発明の目的】

[0007] 本発明の目的は、癌患者に対し、リンパ球の単独投与ではなしに、外科的手術や化学治療あるいは放射線治療等との併用により少なくとも5年以上の長期間にわたり癌の再発を防止する方法を提供することにある。

[0008] 本発明の他の目的は、癌、特に肝臓癌の外科的、あるいは科学的若しくは放射線による治療後に、その後一定期間内に自己若しくは癌患者から採取した活性化リンパ球を併用することにより副作用がきわめて低く、しかも治療後少なくとも5年間以上の長期間にわたる実質的な癌の再発予防方法を提供することにある。

[0009] 本発明の更にその他の目的は、癌患者に対し、リンパ球の単独投与ではなしに、外科的手術や化学治療あるいは放射線治療等との併用により少なくとも5年以上の長期間にわたり癌の再発を防止するための癌の長期再発予防用活性化リンパ球を含む製剤を提供することにある。

#### 【発明の概要】

[0010] 上記目的を達成するため本発明の癌の長期再発予防法は、癌の治療行為とともに、活性化リンパ球投与を併用することからなる。

[0011] 治療行為の対象には特に肝臓癌が有効である。癌の治療行為が外科的手術のほか、化学療法または放射線療法を含む。癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球は、自己又は癌患者から採取したものを増殖培養あるいは活性化培養して得られる。または、癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球は、自己又は癌患者から用事調製により採取できる。あるいは、癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球は、自己又は癌患者から用事調製により採取できる。固相化した抗CD3抗体とインターロイキン2との組み合わせ存在下において、増殖培養あるいは活性化培養した活性化リンパ球を用いることができる。

[0012] 更に、本発明による活性化リンパ球を含む癌の長期再発予防用製剤は、癌の治療行為とともに併用投与されるための、自己又は癌患者から採取した製剤である。斯かる製剤は、インビトロで増殖培養あるいは活性化培養して得ることができる。

## 【最良の実施例の説明】

[0013] 本発明による癌の長期再発予防法およびその製剤について以下に説明する。

[0014] 本発明は、癌、特に肝臓癌の治療行為と、活性化リンパ球投与による癌の再発予防行為とを併行させることにより、癌治療効果の完全を期し、癌の治療後少なくとも5年以上の長期にわたる再発予防効果を発揮させるようにしたものであって、具体的には癌の治療行為とともに、活性化リンパ球投与を併用するようにしたことを特徴とするものである。

[0015] なおここで癌の治療とは、主として外科的な手術を意味し、手術後に、少なくとも複数回の活性化リンパ球投与をおこなうことにより再発を抑制させることを特徴とするものである。また本発明は、癌の治療行為が上記した外科的手術による場合のみならず、化学療法または放射線療法による治療をも含むものである。

## 〔リンパ球細胞の採取〕

[0016] リンパ球細胞の採取については、原則として用事調製により採取するものとし、治療を施すべき癌患者自身の末梢血、あるいは別の癌患者の抹消血から分離して採取する。

[0017] なおこの場合、好ましくは細胞数が $1 \times 10^9$ 個/ml以上のものが、より高い再発防止効果を発揮することができる。末梢血からの採血方法としては、静脈からの採血が好ましく、また一回に採血する量としては、0.01mlから100ml程度であり、特に、その量に限定されない。しかしながら、ドナーの肉体的な負担、採血の手間、リンパ球細胞の分離操作を考えた場合、5mlから50ml程度が好ましく、さらには10mlから20mlの採血量がより好ましい。なおこの場合に、血液の凝固が起こらないように、採血した血液にヘパリンやクエン酸を加えることができる。また上記採取した血液からのリンパ球細胞の分離は、ショ糖や市販のリンパ球分離剤等を用いる不連続密度勾配遠心法などの周知のリンパ球細胞の分離法によっても操作し取得できる。

## 〔リンパ球細胞の増殖〕

[0018] つぎに取得した細胞の増殖培養について説明すると、本発明のリンパ球細胞の増殖は、インターロイキン2と抗CD3抗体を組み合わせ存在下において増殖培養あるいは活性化培養させることにより実施することができる。この場合例えばインターロイキン2を含む培養用培地液にリンパ球細胞を浮遊させ、抗CD3抗体を固相化した培養容器に入れて培養を開始することができる。さらに必要に応じて各種のマイトージェン増殖因子、活性化因子を使用して細胞の増殖・活性化をおこなうことも可能である。

[0019] 抗CD3抗体としては、リンパ球細胞の増殖・活性化を促進できる抗体であれば、特に、限定されるものではない。リンパ球細胞の刺激に用いる抗CD3抗体は、精製したCD3分子を用いて動物又は細胞に産生させることもできるが、安定性、コスト等に優れた市販のOKT-3抗体（製造元：オーソファーマスーティカル）が使用できる。

[0020] 抗CD3抗体は、リンパ球細胞の増殖の効率、操作の容易性の観点から、固相化して用いることが好ましい。抗体を固相化するための器具としては、ガラス、ポリウレタン、ポリオレフィン、ポリスチレン等の材質の培養容器が挙げられる。入手が容易であることから、市販のプラスチック製の滅菌済み細胞培養フラスコ等を使用することもでき、その大きさは適宜選択できる。

[0021] 固相化は、前記抗CD3抗体の希釈液を固相化する器具に添加し、例えば、4℃～37℃の温度雰囲気中で2～24時間、静置することによって行うことができる。この抗CD3抗体の固相化には、抗CD3抗体を滅菌したダルベッコリン酸緩衝液等の生理的な緩衝液中に1～30μg/mlの濃度に希釈して用いることが好ましい。固相化後、使用時までコールドルームや冷蔵庫（4℃）内に保存することができる。使用時に液を除去して、また必要あれば常温のダルベッコリン酸緩衝液等の生理的な緩衝液で洗浄できる。

[0022] また、本発明では培養用培地液中にインターロイキン2を用いることが、増殖の効率の観点から好ましい。インターロイキン2は、市販されているものを用いることができ、培養用培地液1～2000U/mlの濃度となるように用いるのが好ましい。インターロイキン2は、水、生理食塩液、ダルベッコリン酸緩衝液、RPMI-1640、DMEM、IMDM、AIM-V等の一般に広く用いられる細胞培養用培地液等に溶解して使用することができる。なお一度溶解したものは、活性の低下を防ぐため、冷蔵保存することが好ましい。

[0023] この場合に使用される培養用培地液としては、リンパ球細胞の培養に適したものであれば特に制限されず、血清等の生物由来の培養液、平衡塩類溶液にアミノ酸、ビタミン、核酸塩基などを加えた合成培地などが使用でき、RPMI-1640、AIM-V、DMEM、IMDM等が好ましいものとして挙げられ、なかでもRPMI-1640が特に好ましいものとして挙げられる。培養用培地は、正常ヒト血清を添加したものが増殖効果に優れ好ましい。またこれらの培地は市販品を用いることができる。

[0024] 培養は、一般的な細胞培養の方法に従うことができる。例えば、CO<sub>2</sub>インキュベータ内で行うことができる。CO<sub>2</sub>濃度は1～10%、特に5%程度が好ましく、また温度

T0460-090460

については30～40℃、特に37℃前後の温度が好ましい。

〔活性化リンパ球の投与〕

[0025] 活性化リンパ球の投与については、その投与頻度が高ければ高いほど、より多くの効果が望めるが、一般的には数日から数ヶ月に1回程度の頻度で実施するものとする。活性化リンパ球の投与時期については、癌の外科的切除もしくは化学的あるいは放射線による治療後に限らず、外科的もしくは化学的、あるいは放射線による治療前のできるだけ早い時期から開始することにより、より一層の再発防止効果が期待できる。できれば手術後5年間程度の継続的な投与が好ましいが、一般的には治療後6ヶ月～8ヶ月間程度の短期間の投与で治療後少なくとも5年以上長期間にわたる十分な再発防止を期待することができる。

[0026] またこの場合、活性化リンパ球の投与回数については、1回から1、000回程の投与を行う可能性もある。しかし通常1回の投与だけによる効果は比較的薄く、癌の治療後5年以上の長期間にわたる安定した再発予防効果を得るためには治療後8ヶ月間以内に少なくとも5回以上の投与が実施される必要がある。なおこの場合、活性化リンパ球の投与回数が多ければ多いほど好ましいといえるが、いずれにしても、活性化リンパ球の投与に関しては、その頻度、期間、投与数を必要に応じて適宜選択的に決定し、また状況如何によっても変更することができる。

[0027] また本発明は、癌の治療行為とともに併用投与されるための、自己又は癌患者から採取した活性化リンパ球を適当に調整するとともに、この調整された活性化リンパ球を主剤とした癌、とりわけて肝臓癌の長期再発予防用投与製剤としても用いることができる。さらに癌の治療行為とともに併用投与されるための活性化リンパ球について、これをインビトロで増殖培養あるいは活性化培養することにより、均質でしかも安定した活性化リンパ球の培養効率を著しく向上させることができる。

[0028] これら増殖・活性化されたリンパ球は、適用対象者として主に肝臓癌患者に対し、治療後5年以上の長期間にわたる再発予防剤として投与される。しかし本発明は肝臓癌患者に対する投与のみに限定されるものではなく、このほかにも肺癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、腎臓癌、膵臓癌、胆嚢癌、卵巣癌、子宮癌、精巣癌、前立腺癌、白血病、肉腫、脳腫瘍等についての治療に伴う再発防止剤としても用いることができる。

0944360-060401

## 【実施例】

## 〔リンパ球の分離〕

[0029] 注射器を用いて肝臓癌患者の静脈から末梢血20～50mlを、ヘパリンを加えて採血した。クリーンベンチ（昭和科学株式会社製：S-1100）内で無菌的に（以下、無菌的に、と略す）、採血した注射筒の注射針を、接合部近くを触らないようにはずし19G×1 1/2"注射針（発売元：株式会社ニプロ）につけ替えた。50ml遠沈管（岩城硝子株式会社製：2341-050）2本に、洗浄用培地（RPMI 1640+6）（500ml、株式会社日研生物医学研究所製：GM1106）を15mlずつ注ぎ込み、その遠沈管に、採血した血液を培養液で3倍に希釈後、その全てを2本共に等量になるようにゆっくりと注いだ。

[0030] 遠沈管の蓋を完全に閉めた後、2～3回転倒混和した。10mlピペット（輸入発売元：コーニングコースタージャパン：4105）でリンホセパールI（100ml株式会社免疫生物研究所製：23010）を15ml遠沈管（岩城硝子株式会社製：2327-015）6本に各3mlずつ入れ、次に、培地で希釈した血液10mlをそれぞれの遠沈管に、液面を乱さないようにゆっくり重層した。回転数1,800rpm、遠心分離温度20℃、ブレーキをOFFの状態です15分間遠心した（遠心機は株式会社コクサン製：H-700Rを使用）。

[0031] 遠心後、吸引機により無菌的に遠沈管内のリンパ球層の約1cm上までリンパ球細胞を吸い取らないようにゆっくり吸い取った。5mlピペットマンで血餅の層を吸い取らないようにリンパ球細胞の層をとり、これをあらかじめ、洗浄用培地（RPMI 1640+6）を25ml入れておいた50ml遠沈管内に回収した。遠沈管の蓋を閉め2～3回転倒混和した後、回転数1,800rpm、遠心分離温度20℃の状態で10分間遠心した。遠心後、上清みを捨て、細胞沈渣をボルテックスにかけて良くほぐした。

[0032] 培地（RPMI 1640+7）（株式会社免疫生物研究所製）44mlに35,000U/ml IL-2（シータス社製）1mlと、ヒト血清5mlを含む培養用培地（以下、培養用培地と略すこともある）50mlに入れて良く転倒混和し、細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液10μlをチューブ（輸入発売元：アシスト株式会社：72,690）にとり、これを40μlのチュルク液（武藤化学薬品社製）と混合し、血球計算版（エルマー社製：9731）に10μlをのせ、顕微鏡（オリンパス光学工業株式会社製：211320）下で

細胞数を測定した結果、総細胞数は $1.0 \times 10^7 \sim 7.0 \times 10^7$ 個だった。

#### 〔OKT3固相化フラスコの調製〕

[0033] PBS (－) で $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製しておいたOKT3 (輸入発売元: ヤンセン協和株式会社、製造元: オーソファーマスーティカル: OKT3注) 溶液を、底面積 $225 \text{ cm}^2$ の培養用フラスコ (住友ベークライト株式会社製: MS-2080R) に $10 \text{ ml}$ 入れ、底面に溶液を均一に浸した。翌日、フラスコのOKT3溶液を吸引機で吸い取り、PBS (－)  $50 \text{ ml}$ をフラスコに注ぎ込みフラスコの蓋を閉めて激しく振った後、蓋を開け、液を捨てた。再度、無菌的にPBS (－)  $50 \text{ ml}$ をフラスコに注ぎ込みフラスコの蓋を閉めて激しく振った後、蓋を開け、液を捨てた。フラスコ内と蓋に残っている液を吸引機で丁寧に吸い取り、OKT3固相化フラスコの調製を行った。

#### 〔リンパ球の活性化培養〕

[0034] 前記〔リンパ球の分離〕において調製した細胞懸濁液 $50 \text{ ml}$ を〔OKT3固相化フラスコの調製〕において調整したOKT3固相化フラスコに分注し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%濃度の炭酸ガス存在下において培養をおこなった。3日後、培養用培地 $50 \text{ ml}$ を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、5%濃度炭酸ガス存在下において培養をおこなった。さらに4日後、培養用培地 $150 \text{ ml}$ を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、5%濃度炭酸ガス存在下において培養をおこなった。さらに2日間、 $37^\circ\text{C}$ 、5%濃度炭酸ガス存在下において培養をおこなうことにより活性化リンパ球 $2.0 \times 10^8 \sim 7.0 \times 10^8$ 個を得た。

#### 〔リンパ球の増大培養〕

[0035] 上記〔リンパ球の活性化培養〕で調整したリンパ球をLL-7培地 (日研生物医学研究所) あるいはMedium 930 (コージンバイオ社)  $750 \text{ ml}$ を含むガス透過性培養バッグに移し、炭酸ガスインキュベーター (CDP-300A; ヒラサワ社) 中で $37^\circ\text{C}$ 、5%炭酸ガス雰囲気下で培養をおこなった。2日後、細胞を含むガス透過性培養バッグ (株式会社ニプロ社製ニプロカルチャーバッグA-1000) と新たな培地を含むガス透過性培養バッグを無菌接合装置 (テルモ社製) により連結し、両ガス透過性培養バッグ中の培地を良く混合した後、再度その結合を切除し、接合部分を無菌的にシールした後、 $37^\circ\text{C}$ 、5%炭酸ガス下で培養をおこなった。

[0036] さらに2日後、同様にして培養中のガス透過性培養バッグ2バッグと、新たな培地を含むガス透過性培養バッグ2バッグを用いて均一に細胞を分散させた培地を含む4つのガ

ス透過性バッグを作成して培養をおこなった。さらに2日後、細胞を含む4つのガス透過性バッグと新たなガス透過性バッグ2バッグとを用いて均一に細胞を分散させた培地を含む6つのガス透過性バッグを作成して培養をおこなった。

〔投与製剤の調整〕

[0037] その2日後に、上記のうち3～6バッグのガス透過性バッグの中の細胞を含む培地を250ml遠心管（コーニング社製）内に移し、遠心により細胞の分離をおこなった。デカンテーションにより培養液を除去し、細胞ペレットに生理食塩水を加え、細胞を再懸濁し、遠心分離により細胞の洗浄操作をおこなった。さらに再度同様の洗浄操作をおこなうとともに、上記生理食塩水に代えて0.1%のヒトアルブミンを含む生理食塩水により洗浄操作をおこなって細胞ペレットを調整した。

[0038] さらに上記細胞ペレットに2%のヒトアルブミンを含む生理食塩水200mlを加えて懸濁し、これを100μmのステンレス金網にて濾過後、輸血用のバッグに詰めて投与用製剤とした。なおこの場合の輸血用バッグに含まれる細胞数は、 $6 \sim 20 \times 10^9$ 個であった。

〔投与製剤の投与〕

[0039] 上記〔投与製剤の調整〕で調整した投与用製剤を、〔リンパ球の分離〕で採血した肝臓癌患者に対し、静脈より注入投与した。肝臓癌の手術後3週間以内に3回、3ヶ月および6ヶ月目に、それぞれ1回ずつの、合計5回の投与を実施した。

〔再発予防効果の判定〕

[0040] リンパ球投与群49例、リンパ球非投与群52例について、それぞれ癌の治療時から5年経過後の癌再発率を解析した。その結果、無再発生存率は、後者（リンパ球非投与群）では21%であったのに対し、前者（リンパ球投与群）では35%であり、1%の危険率で有意差があった。また、重篤な副作用は認められず投与群の一部に軽度の発熱が認められた。このことにより本発明の活性化リンパ球は癌（とりわけ肝臓癌）の治療後における少なくとも5年以上にわたる長期再発予防効果があること、及び副作用が極めて低いことが明らかとなった。

[0041] なお上記〔投与製剤の調整〕において調整された活性化リンパ球の凍結保存の具体的一例を挙げると、〔投与製剤の調整〕で得た活性化リンパ球を遠心分離し、培養用培地をデカンテーションにより除去し、細胞ペレットを得るとともに、該細胞ペレットに細胞保存液



(ヒト血清5ml、ジメチルスルホキシド(ナカライテスク株式会社製、以下、「DMSO」と略すこともある)5mlと培地(RPMI1640+7)40mlを混合し作製)を18ml加え、良く混合後5mlの細胞保存用チューブ(輸入発売元:コーニングコースター・ジャパン)あたり3mlずつ計5本のチューブに分注(5×10<sup>7</sup>個/チューブ)し、さらにチューブを超低温フリーザーに入れ、-80℃で保存する。

[0042] また上記凍結保存細胞を融解・復元する場合には、凍結保存しておいた細胞を取り出し、これを37℃のヒートブロック(タイテック株式会社製:TAL-1G)で4分間温め、凍結保存細胞の融解・復元をする。融解・復元した細胞を含む細胞保存液約3mlを15ml遠沈管内に無菌的に移し、さらに生理食塩液を10ml注ぎ込み懸濁し、これを遠心分離(1,000rpm、20℃、5分間)した後、デカンテーションにより上清を捨て、生理食塩液10mlを加え懸濁する。さらに、遠心分離後(1,000rpm、20℃、5分間)、デカンテーションにより上清を捨て、生理食塩液10mlを加えて懸濁し、再度、遠心分離後(1,000rpm、20℃、5分間)、デカンテーションにより上清を捨て、5%のヒト血清アルブミンを含む生理食塩10mlを加え懸濁し、投与用製剤を調製することができる。

[0043] 癌の最も恐ろしいことの一つは癌の再発の問題であり、再発がなければ多くの癌の治療は容易となる。この意味からして、癌の治療後一定期間内に自己若しくは癌患者由来の活性化リンパ球を5回以上投与するようにした本発明は、癌の根治に画期的作用をもたらすものであって、以上に詳述した通り、本願の発明は、癌、特に肝臓癌の外科的手術若しくは放射線治療、又は抗癌剤投与等の化学的癌治療における治療後の8ヶ月間以内に、治療を施すべき癌患者自身の末梢血、あるいは別の癌患者の抹消血から分離して採取した活性化リンパ球を、少なくとも5回以上の活性化リンパ球投与をおこなうようにしたために、治療効果と再発防止効果とによる相乗効果により、各種の癌、とりわけ肝臓癌の長期間再発防止にきわめて有効となり、治療後5年間以上の長期にわたる再発予防効果が確認された。

[0044] またこの場合において、癌が外科的に完全に除去しきれていない場合においても、癌の進行抑制剤としての効果があることが臨床的に確認されている。また本発明の活性化リンパ球投与による癌の再発防止は、人体に対する処方のみならず、イヌ、ネコ等のペット類や、あるいはウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ等の家畜類、その他の動物についての癌の再発防止にも有効である。

[0045] 本発明をある程度詳細に最良の実施態様について説明したが、その好ましい実施態様についてのこの説明は構造の詳細については変えてあるので、構成要素の組み合わせと配列とは以下に請求する本発明の精神と範囲に反することなく種々に改変することを妨げるものではない。

T04060"0364660

## 【特許請求の範囲】

1. 癌の治療行為とともに、活性化リンパ球投与を併用するようにした癌の長期再発予防法。
2. 治療行為の対象となる癌が肝臓癌であるクレーム1に記載の癌の長期再発予防法。
3. 癌の治療行為が外科的手術であるクレーム1に記載の癌の長期再発予防法。
4. 癌の治療行為が外科的手術であるクレーム2に記載の癌の長期再発予防法。
5. 癌の治療行為が外科的手術のほか、化学的療法または放射線療法を含むクレーム1に記載の癌の長期再発予防法。
6. 癌の治療行為が外科的手術のほか、化学的療法または放射線療法を含むクレーム2に記載の癌の長期再発予防法。
7. 癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球が自己又は癌患者から採取したものを増殖培養あるいは活性化培養したものであるクレーム1に記載の癌の長期再発予防法。
8. 癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球が自己又は癌患者から採取したものを増殖培養あるいは活性化培養したものであるクレーム3に記載の癌の長期再発予防法。
9. 癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球が自己又は癌患者から用事調製により採取してなるクレーム1に記載の癌の長期再発予防法。
10. 癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球が自己又は癌患者から用事調製により採取してなるクレーム3に記載の癌の長期再発予防法。
11. 癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球が自己又は癌患者から用事調製により採取してなるクレーム7に記載の癌の長期再発予防法。
12. 癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球が自己又は癌患者から用事調製により採取したものであって、しかも細胞数が $1 \times 10^9$ 個/ml以上であるクレーム1に記載の癌の長期再発予防法。
13. 癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球が自己又は癌患者から用事調製により採取したものであって、しかも細胞数が $1 \times 10^9$ 個/ml以上であるクレーム3に記載の癌の長期再発予防法。
14. 癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球が自己又は癌患者から用事調製により採取したものであって、しかも細胞数が $1 \times 10^9$ 個/ml以上であるクレーム7に記載の癌の長期再発予防法。

15. 癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球が自己又は癌患者から用事調製により採取したものであって、しかも細胞数が $1 \times 10^9$ 個/ml以上であるクレーム9に記載の癌の長期再発予防法。

16. 癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球が、固相化した抗CD3抗体とインターロイキン2との組み合わせ存在下において、増殖培養あるいは活性化培養したものであるところのクレーム1に記載の癌の長期再発予防法。

17. 癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球が、固相化した抗CD3抗体とインターロイキン2との組み合わせ存在下において、増殖培養あるいは活性化培養したものであるところのクレーム3に記載の癌の長期再発予防法。

18. 癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球が、固相化した抗CD3抗体とインターロイキン2との組み合わせ存在下において、増殖培養あるいは活性化培養したものであるところのクレーム7に記載の癌の長期再発予防法。

19. 癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球が、固相化した抗CD3抗体とインターロイキン2との組み合わせ存在下において、増殖培養あるいは活性化培養したものであるところのクレーム9に記載の癌の長期再発予防法。

20. 癌の治療行為と併用される活性化リンパ球の投与が、癌の治療行為後8ヶ月間であるところのクレーム1に記載の癌の長期再発予防法。

21. 癌の治療行為と併用される活性化リンパ球の投与が、癌の治療行為後8ヶ月間以内に、少なくとも5回以上おこなわれるものであるところのクレーム1に記載の癌の長期再発予防法。

22. 癌の治療行為とともに併用投与されるための、自己又は癌患者から採取した活性化リンパ球を含む癌の長期再発予防用製剤。

23. 癌の治療行為とともに併用投与されるための活性化リンパ球が、インビトロで増殖培養あるいは活性化培養したものであるところのクレーム22に記載の癌の長期再発予防用製剤。

## 癌の長期再発予防法および癌の長期再発予防用活性化リンパ球を含む製剤

### 【発明の要約】

癌の外科的手術もしくは放射線あるいは化学的治療行為の後、8ヶ月以内の期間内に少なくとも5回以上の活性化リンパ球投与をおこなうことで、各種の癌、とりわけ肝臓癌の治療から5年以上の長期間にわたる再発防止にきわめて有効となる。癌の治療行為と併用して投与される活性化リンパ球は、自己又は癌患者から用事調製により採取するか、自己又は癌患者から用事調製により採取できる。固相化した抗CD3抗体とインターロイキン2との組み合わせ存在下において、増殖培養あるいは活性化培養した活性化リンパ球を用いることができる。

L04060-09E460